

PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE. — *Microgreffage de points végétatifs de Sequoiadendron giganteum Buchholz séculaires sur de jeunes semis cultivés in vitro*. Note de **Olivier Monteuis**, présentée par Roger Gautheret.

Une nouvelle technique de microgreffage permet de greffer avec succès, sur de jeunes semis cultivés *in vitro*, des méristèmes de *Sequoiadendron giganteum* prélevés sur de jeunes pousses en repos végétatif de sujets centenaires. 35 % des greffons évoluent rapidement en pousses feuillées comparables au type morphologique juvénile.

PLANT PHYSIOLOGY. — *In vitro* micrografting of *Sequoiadendron giganteum* meristems.

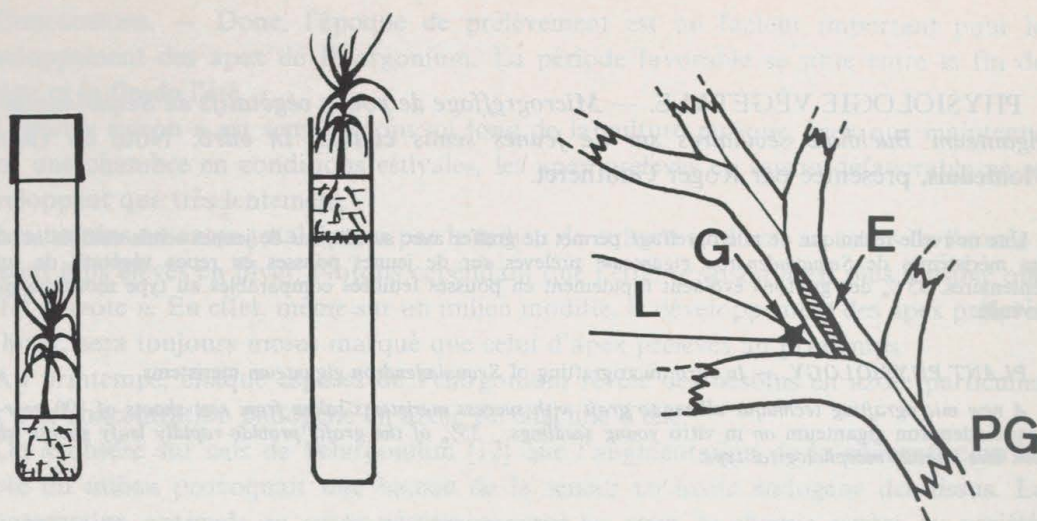
A new micrografting technique allows to graft with success meristems taken from rest shoots of 100 year-old *Sequoiadendron giganteum* on *in vitro* young seedlings. 35% of the grafts provide rapidly leafy shoots which look like juvenile morphological type.

INTRODUCTION. — Plusieurs travaux ([3], [5], [9]) mentionnent que le greffage, sur de jeunes porte-greffes, d'axes végétatifs prélevés sur des sujets âgés peut favoriser la réacquisition de caractéristiques morphogénétiques de type juvénile au niveau du greffon. Cette évolution est d'autant plus facile à obtenir que le greffon est le moins différencié sur le pied-mère d'origine et nécessite généralement plusieurs générations de greffes successives ([4], [8]). En ce sens, le fait de limiter la taille du greffon au point végétatif peut être avantageux. Sur notre matériel d'études, *Sequoiadendron giganteum* Buchholz, ce projet est difficilement réalisable en conditions horticoles traditionnelles [9]. Pour cette raison, une technique de microgreffage *in vitro* dans un environnement plus adapté car mieux contrôlé en limitant les risques de contaminations, a été mise au point selon les modalités décrites ci-dessous.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — 1. *Obtention des porte-greffes*. — Les graines, conservées en chambre froide ($+1^{\circ}\text{C}$), sont immergées durant 24 h dans une solution titrant 2 g/l de bénomyl et additionnée de quelques gouttes de mouillant Tween 80 afin de prévenir les risques de contaminations assez fréquents par *Botrytis cinerea*. Après un trempage de 4 à 5 mn dans une solution d'éthanol à 50 %, puis dans du chlorure mercurique à $1^{\circ}/_{1000}$, les graines sont abondamment rincées dans quatre bains d'eau distillée stérilisée, puis réparties aseptiquement dans des bocaux de culture de 0,5 l garnis au tiers de leur hauteur de vermiculite imbibée d'eau stérilisée. Ces récipients, hermétiquement fermés par une bande de parafilm, sont ensuite disposés en chambre de culture où des tubes fluorescents « Mazda Fluor lumière du jour de luxe » assurent une intensité lumineuse de 10 W/m^2 pendant 16 h; la température est fixée à $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$. 2 semaines plus tard, les racines apparaissent. Au stade cotylédons étalés — émergence de l'épicotyle, soit 4 à 5 semaines après la germination, les plantules sont repiquées individuellement dans des tubes de culture droits de $20 \times 160\text{ mm}$ coiffés de façon non hermétique de capuchons en matière plastique transparente. Chaque tube contient une motte cylindrique de $25 \times 30\text{ mm}$ en fibres de polypropylène imbibée de 5 ml de la solution minérale de Murashige et Skoog [10] additionnée de 30 g/l de saccharose. Ce support est destiné à faire corps avec la plantule grâce à un système racinaire vigoureux. Dès que l'épicotyle atteint 2 à 3 cm de hauteur, le greffage peut être effectué.

2. *Origine des greffons*. — Les greffons sont prélevés sur des rameaux de *Sequoiadendron giganteum* centenaires greffés et élevés en conteneurs dans une salle climatique où les conditions ambiantes sont similaires à celles de la chambre de culture *in vitro*, exceptée l'intensité lumineuse fixée à 17 W/m^2 pour une humidité relative de 75 %.

3. *Technique de greffage*. — Les manipulations sont effectuées en conditions aseptiques; le greffage est réalisé sous loupe binoculaire et la source lumineuse est transmise par fibres optiques. Le porte-greffe, solidaire de son support synthétique (fig. 1), est délicatement amené vers l'orifice du tube de culture pour ne sortir que la partie supérieure de l'axe épicotylé (fig. 2) qui est alors entaillé latéralement par une incision longitudinale de 1 à 2 mm de long réalisée à l'aide d'un éclat de lame de rasoir (fig. 3). Le greffon, prélevé par une dissection rapide, est constitué par le dôme apical du méristème caulinaire avec ses primordia et éventuellement une ébauche foliaire; la base est taillée en biseau et l'ensemble, hors tout, n'excède pas 0,4 mm. L'explant, posé



Étapes chronologiques du greffage. Fig. 1. : semis porte-greffe en culture *in vitro* sur motte synthétique. Fig. 2. : porte-greffe prêt à être greffé. Fig. 3. : le greffon (G) sur l'éclat de lame de rasoir ayant servi au prélèvement (L) est inséré dans l'entaille (E) effectuée sur l'axe épicotylé du porte-greffe (PG).

Micrografting successive stages. Fig. 1: young seedling stock-plant growing *in vitro* on synthetic substrate. Fig. 2: stock-plant ready for grafting. Fig. 3: the scion (G) on the razor slide used for the removal (L) is introduced into the cut (E) made on the stock-plant epicotyl (PG).

sur l'extrémité de l'éclat de lame de rasoir utilisé pour le prélèvement, est immédiatement et très délicatement inséré dans la fente préalablement effectuée sur le porte-greffe (fig. 3). Cette étape s'apparente, à une échelle beaucoup plus réduite, à la technique de greffage traditionnelle et il importe d'en respecter les modalités usuelles : rapidité, coupe franche, polarité du greffon, position correcte de l'implant afin de faciliter précocement l'adhérence entre greffon et porte-greffe. L'opération réalisée, le porte-greffe est replacé dans les conditions de culture initiales.

RÉSULTATS. — Le succès du greffage est conditionné par la dextérité du manipulateur et par l'état de la pousse au moment du prélèvement. En période de repos végétatif, nous obtenons 35 % de réussite sur 90 greffes réalisées. Au contraire, les méristèmes prélevés sur des axes en croissance ont tendance à s'oxyder, avant de dépérir. Dans les situations favorables, la soudure s'effectue rapidement par prolifération des tissus corticaux du porte-greffe. L'organogenèse, puis le développement de la nouvelle pousse commence 2 à 3 semaines après le greffage. Les toutes premières feuilles formées sont quelque peu atrophiées, conséquence vraisemblable du traumatisme causé par le greffage; puis la morphologie du greffon s'identifie au type juvénile [9].

Un sevrage progressif favorise la croissance de la nouvelle pousse en évitant une trop forte concurrence avec l'appareil caulinaire du porte-greffe. L'acclimatation en conditions horticoles est facilitée par la qualité du système racinaire développé sur substrat fibreux.

DISCUSSION, CONCLUSIONS. — La méthode proposée, applicable dans son principe à bon nombre d'autres espèces, permet de greffer avec un rendement de 35 % des points végétatifs de sujets âgés sur de jeunes semis cultivés *in vitro*.

Du point de vue technique, la motte en substrat synthétique est avantageuse car elle permet de sortir sans dommage le porte-greffe du tube pour faciliter le greffage. D'autre part, chimiquement neutre, elle garantit la composition de la solution nutritive qui peut être modifiée en cours de culture si besoin est. La fente latérale, quant à elle, évite le

déssèchement du méristème implanté et favorise l'union du greffon et du porte-greffe dans un micro-environnement propice, à l'abri d'une lumière trop forte.

Cette possibilité de greffer des méristèmes peut être exploitée à diverses fins, en biologie fondamentale comme dans des domaines plus appliqués tels que l'arboriculture fruitière ([1], [2], [6], [7]). C'est également un moyen de profiter des avantages reconnus de la culture des méristèmes en substituant au milieu de culture artificiel, généralement gélosé, un support naturel : le porte-greffe. Cette solution paraît plus judicieuse, tant du point de vue pratique que physiologique, notamment pour recouvrer certaines caractéristiques des formes juvéniles telles que l'aptitude à la multiplication végétative. Les premiers résultats d'une étude comparative sur le clonage d'arbres âgés à partir de méristèmes vont dans ce sens.

Remise le 14 octobre 1985, acceptée le 16 décembre 1985.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] J. ALSKIEF, *Comptes rendus*, 284, série D, 1977, p. 2499-2502.
- [2] J. ALSKIEF et P. VILLEMUR, *Comptes rendus*, 287, série D, 1978, p. 1115-1118.
- [3] J. CREZE, *Jardins de France*, 1984, p. 104-105.
- [4] T. DE LA GOUBLAYE DE NANTOIS, *D.E.A.*, Université de Paris-VI, 1980, p. 1-44.
- [5] J. DOORENBOS, *Preb.* 115, Wageningen, 1953, p. 98-102.
- [6] R. JONARD, J. HUGARD, J.-J. MACHEIX, J. MARTINEZ, L. MOSELLA-CHANCEL, J.-L. POESSEL et P. VILLEMUR, *Scientia hortic.*, 20, 1983, p. 147-159.
- [7] J. MARTINEZ, J. HUGARD et R. JONARD, *Comptes rendus*, 288, série D, 1979, p. 759-762.
- [8] J.-P. MISSON et P. GIOT-WIRGOT, *Annales Afocel*, 1984, p. 187-197.
- [9] O. MONTEUUIS, *Annales Afocel*, 1984, p. 139-171.
- [10] T. MURASHIGE et F. SKOOG, *Physiol. Plant.*, 15, 1962, p. 473-497.

Laboratoire de Phytomorphogenèse, associé au C.N.R.S., L.A. n° 45,
4, rue Ledru, 63038 Clermont-Ferrand Cedex;

Association Forêt-Cellulose,
domaine de l'Étançon, 77370 Nangis.